Aus dem Hygienischen Institut Basel. Vorsteher: Prof. R. Doerr

Untersuchungen über die Natur der filtrierbaren Vira und die Resistenz des Hühnerpestvirus gegen zellschädigende Einflüsse (Gerbstoffe, Oligodynamie).

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Paul Schweizer
von Basel

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Druck von R. Oldenbourg in München
1921

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt
auf Antrag von Prof. R. Doerr

Zur experimentellen Bearbeitung allgemeiner Probleme, welche die Natur und die Eigenschaften der sog. ultramikroskopischen Krankheitserreger oder, richtiger ausgedrückt, der mikroskopisch noch nicht erfaßten Infektionsstoffe betreffen, pflegt man fast ausschließlich das Virus der Hühnerpest zu verwenden, weil dasselbe eine ganze Reihe wertvoller versuchstechnischer Vorzüge in sich vereint, die gerade in dieser Gruppe der Kontagien zu den Seltenheiten gehören. Die Erregerelemente treten nicht nur in Zellen sondern überwiegend frei in den Körperflüssigkeiten (im Plasma resp. im Serum, im Perikardial- und Peritonealexsudat) auf und finden sich in diesen Substraten bei akutem Krankheitsverlauf konstant und meist auch in beträchtlichen Mengen; ihre Verteilung im Serum oder im infektiösen Exsudat muß den Charakter einer homogenen und sehr stabilen Suspension haben, da sich andernfalls die außerordentlich exakte Dosierbarkeit, wie sie z. B. in den Versuchen von Ruß oder von Doerr und R. Pick zutage tritt, kaum erklären ließe. Diese Dosierbarkeit, welche sehr feine Abstufungen des inokulierten Infektionsstoffes gestattet, hängt aber natürlich nicht nur vom injizierten Material sondern auch von der Empfänglichkeit des Versuchstieres ab; je allgemeiner und je hochgradiger die Empfänglichkeit ist, desto günstiger und eindeutiger gestalten sich die Bedingungen des Experimentes und werden schließlich optimal, wenn sich die Verhältnisse der bei mikroskopischen Krankheitserregern beobachteten „Einkeimdisposition“ nähern. Es scheint nun keinem Zweifel zu unterliegen, daß die im Handel Mitteleuropas gangbaren Hühnerrassen für die künstliche Infektion durch intramuskuläre Einspritzung von Hühnerpestvirus in hohem Maße und ohne individuelle Ausnahmen dispo-

niert sind, vorausgesetzt, daß man von einem hochvirulenten Hühnerpeststamm ausgeht. Weder Doerr und R. Pick noch ich selbst konnten feststellen, daß einzelne Exemplare im Sinne einer angeborenen Resistenz völlig refraktär waren, oder daß im Reihenversuch mit fallenden Mengen eines virushaltigen Substrates das mit der größten Dosis infizierte Huhn gesund blieb und überlebte, während das mit der kleineren Quantität inokulierte an Hühnerpest erkrankte und einging. Bei gegenteiligen Angaben, denen man in der umfangreichen Literatur über Hühnerpest wohl nur ganz vereinzelt (z. B. bei Mrowka) begegnet, erscheint die Annahme einer angeborenen individuellen oder durch die Rasse bedingte Resistenz weit weniger plausibel als der Gedanke an eine vorausgegangene Verseuchung der nicht reagierenden Tiere. Es ist ja seit Ostertag und Wolffhügel bekannt und durch die neueren Erfahrungen von Erdmann bestätigt, daß die spontane Erkrankung nicht immer letal verläuft, sondern speziell bei jüngeren Hühnern in Genesung übergehen kann und daß in solchen Fällen eine absolute Immunität zurückbleibt, die auch der willkürlichen Infektion mit massiven Dosen virushaltigen Materials standhält.

In Gegenden, in welchen die Hühnerpest en- oder epizootisch herrscht, muß man diese Eventualität im Auge behalten; jedenfalls würde ein ungesetzmäßiges Verhalten der Hühner gegen die künstliche Infektion, auch wenn es nicht allzu frequent wäre, das Arbeiten mit diesem Virus sehr erschweren und die Deutung der Ergebnisse auch dann unsicher machen, wenn man die Zahl der gleichartigen Einzelversuche erheblich vermehrt. Das trifft aber — wie erwähnt — für die meisten Länder nicht zu; vielmehr ist die Infektiosität des Hühnerpestvirus auch in quantitativer Beziehung für das Huhn so konstant, als das prinzipielle Untersuchungen über Infektionsstoffe erheischen, für deren Nachweis als einziges Reagens eben nur die Infektiosität zu Gebote steht.

Es sind aber nicht nur versuchstechnische Motive, welche die Wahl des Hühnerpestvirus für die Entscheidung allgemeinerer Fragestellungen rechtfertigen. Mit gewissen selbstverständlichen Einschränkungen darf man diesen Infektionsstoff wohl für einen charakteristischen Repräsentanten der ganzen Gruppe der mikroskopisch nicht erfaßten oder vielleicht de facto nicht erfaßbaren Krankheitskeime erklären. Manche Eigenschaften wie z. B. die Widerstandsfähigkeit gegen Glyzerin, die Fähigkeit, in manchen Geweben die Entwicklung eigentümlicher Reaktionsprodukte zu veranlassen usw., teilt er mit andern Vira dieser Kategorie, und in einer Hinsicht ist er ihnen sogar überlegen: in bezug auf seine Filtrierbarkeit. Man legt allerdings gerade auf das letztgenannte Kriterium immer weniger Gewicht. v. Esmarch, Borrel, Rosenthal, Schmidt, Hofstädter, Marchoux, Bigelow, Doerr u. v. a. haben gezeigt, daß sich die verschiedenen Filtertypen nicht eignen, um die Größe von Mikroben auch nur mit approximativer Genauigkeit zu bestimmen und daß insbesondere die Filtrierbarkeit durch „bakteriendichtes“ Filtermaterial keineswegs die Aussage gestattet, daß die passierenden Mikroben submikroskopische Dimensionen haben müssen. Zu diesem Schlusse, den übrigens schon Borrel im Jahre 1903 klar formuliert hat, gelangt auch neuerdings W. Frei, der die physikalische Chemie des Filtrationsprozesses auf Grund der be-

reits vorliegenden Forschungsresultate und gestützt auf theoretische Betrachtungen eingehend erörtert und nachweist, daß man es hier mit einem äußerst komplexen Vorgang zu tun hat, der von zahlreichen, sich in unberechenbarerweise kombinierenden Faktoren beeinflußt wird. Wie sehr man Täuschungen unterworfen ist, wenn man der Filtrierbarkeit von Infektionsstoffen zu große Bedeutung beimißt, kann man aus der jüngsten Peripetie der Lehre von der Gelbfieber-Ätiologie ersehen. Hier galt der submikroskopische Charakter des Erregers als gesichert, da sich die mit Berkefeld- oder dichten Chamberlandkerzen erzielten Filtrate als pathogen erwiesen (Francis und Beyer); nach den Arbeiten von Noguchi ist es aber sehr wahrscheinlich, daß das Gelbfieber durch die Leptospira icteroides hervorgerufen wird, die im gefärbten Präparat (Giemsa, Fontana) oder im Dunkelfeld ohne weiteres sichtbar ist. Die Leptospira icteroides ist 4 bis 9 μ lang, aber nur 0,2 μ breit und an ihren beiden Enden zu Spitzen von extremer Feinheit verjüngt, eine Gestalt, die ihr offenbar trotz der mikroskopischen Länge das Durchschlüpfen durch enge Filterporen, von dem sich auch Noguchi überzeugen konnte, erlaubt.

Wenn sich jedoch auch die Größenverhältnisse der Mikroben durch die Filtration nicht genau bestimmen lassen, so kann man doch mit Hilfe dieses Verfahrens grobe Unterschiede der Dimensionen sehr wohl ermitteln, speziell wenn man die Porenweite und damit die Permeabilität durch Anwendung der Bechholdschen Ultrafiltration noch weiter herabsetzt. Und da muß entschieden zugegeben werden, daß die Filtrabilität des Hühnerpestvirus, soweit bekannt, ein Maximum darstellt. Schon Rosenthal vermochte kein poröses Filter zu ermitteln, welche dieses Virus immer vollständig zurückhielt, obwohl begreiflicherweise eine Reduktion der Infektiosität (Keimverminderung) eintrat, die sich bei manchen Filtersorten bis auf 0,1 $^0/_{00}$ steigerte. Erst v. Provazek war imstande, Hühnerpestelemente von der Suspensionsflüssigkeit durch Filtration vollkommen abzusondern, als er zu diesem Zwecke 3% Agarfilter, also Ultrafilter aus Kolloidgelen, verwendete. Andriewsky ging auf diesem Wege noch einen Schritt weiter, indem er die Porosität der Ultrafilter abzustufen suchte. In Anlehnung an Bechholds Methodik tränkte er Filterpapier mit 3, 4, 5, 6, 7 und 8% Eisessigkollodium und preßte durch diese Kollodiummembranen Hühnerpestserum, welches 15- bis 20fach mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und mit einer 1proz. Lösung von Hämoglobin versetzt war. Es stellte sich heraus, daß die mit dem 3proz. Kollodiumfilter gewonnenen Filtrate (in der Menge von 5 cm^3 injiziert!) für Hühner virulent waren, obwohl sie kein Hämoglobin, sondern nur die Proteine des Hühnerserums enthielten. 4- und 5proz. Kollodiumfilter, welche schon den Hauptbestandteil der Serumproteine zurückhielten, gaben noch immer ein infektiöses Filtrat (geprüfte Dosis = 2 cm^3) und erst die 6- bis 8proz. Membranen, welche nicht einmal mehr den spurweisen Durchtritt von Serumglobulin und Serumalbumin gestatten, erwiesen sich für die Hühnerpestelemente als impermeabel. Andriewsky folgert hieraus, daß das „Kolloid des Hühnerpestvirus" aus Mizellen bestehen müsse, welche kleiner sind als die Moleküle des Hämoglobins, d. h. kleiner als 2,3 bis 2,5 μ. Dagegen kann indessen mancherlei geltend ge-

macht werden, vor allem der Umstand, daß die Reaktionen, mit denen die Existenz des Testkolloides einerseits, jene des Virus anderseits im Filtrate nachgewiesen wird, einen sehr verschiedenen Feinheitsgrad besitzen. Ein einziges Erregerelement, welches das Filter passiert, kann, selbst wenn es in mehreren cm^3 Filtrat allein vorkommt, durch den Infektionsversuch an dem so empfindlichen Huhn festgestellt werden, während die optischen Proben auf Hb und die chemischen auf Eiweiß bei fortschreitender Verdünnung ihrer Lösungen bald versagen. Eine vorübergehende Gelegenheit zum Durchtritt vereinzelter Erregerteilchen, die dann sistiert, erscheint aber durch den Beginn der Filtration (beim Ultrafilter durch das Einschalten des Druckes mehrerer Atmosphären) gegeben; später verlegen sich die spärlichen Poren von weiterem Kaliber durch Verschlammung mit den Kolloiden des Filtrans und die transitorische Phase initialer Durchlässigkeit genügt zwar für die Passage einer nachweisbaren Zahl von Hühnerpestkeimen, nicht aber für den Durchtritt einer qualitativ feststellbaren Menge von Hb- oder Eiweißmolekülen bzw. Molekülaggregaten. Aber so viel darf man doch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Hühnerpestkeime tatsächlich sehr geringe Ausmessungen besitzen, und daß sich daher bei ihnen jene Eigenschaften, die sich als rein physikalische Konsequenzen der minmalen Dimension und des Mißverhältnisses der Oberfläche zum Volumen und zum Gewicht ergeben müssen, in besonders ausgeprägter Form vorfinden werden.

So ist das Hühnerpestvirus stets das experimentelle Paradigma der „infravisiblen" und der „filtrierbaren" Krankheitserreger geblieben und wurde naturgemäß auch herangezogen, um Beweise für die Existenz unbelebter Infektionsstoffe zu erbringen. Diese Theorie war ja von vornherein auf ein Gebiet verwiesen, auf welchem sie nicht durch die direkte Beobachtung lebender Zellen als notwendiger Träger der Infektiosität widerlegt werden konnte; hier scheint sie aber Raum zu gewinnen und ist durch Versuche gestützt worden, welche eine glatte diskussionslose Ablehnung nicht mehr angezeigt erscheinen lassen. Es ist hier nicht der Ort, um diese Frage in ihrer Totalität aufzurollen und kritisch zu beleuchten; es mag genügen, wenn wir auf die Arbeiten über die infektiöse Anämie der Pferde (K. und R. Seyderhelm, van Es und Schalk, Klempin, Wirth u. a.), über die Mosaikkrankheit des Tabaks (Beijerinck, Iwanowsky, Hunger) und speziell auf die interessanten, den medizinischen Forschern viel zu wenig bekannten Untersuchungen über die infektiöse Panachierung der Malvaceen (Erwin Baur) verweisen. Eingehender sollen in dieser Mitteilung nur jene Publikationen besprochen werden, in welchen das Hühnerpestvirus als unbelebte Substanz hingestellt wird, vor allem eine Veröffentlichung von Mrowka. Mrowka hält das Virus der Hühnerpest für eine eigenartige Modifikation des Serumglobulins des Hühnerplasmas, welches gleich seiner Muttersubstanz aus dem Sol- in den Gel-Zustand übergeführt d. h. ausgeflockt werden kann; das virulente Globulingel ist reversibel und in Anbetracht seiner unbegrenzten Übertragbarkeit von Huhn zu Huhn vermehrungsfähig, was wohl so verstanden werden soll, daß das virulente Globulin die Kraft besitzt, die Globuline gesunder Hühner in die pathogene Variante umzusetzen. Die experimentellen

Tatsachen, auf welche Mrowka diese Auffassung basiert, laufen hauptsächlich auf das Grundphänomen hinaus, daß das Virus mit den Globulinen der eiweißhaltigen infektiösen Körperflüssigkeiten sehr enge, fast untrennbar verkettet erschien, daß es durch Tannin, Ammonsulfat, Dialyse gleichzeitig mit den Globulinen gefällt wurde, in den Niederschlägen durch den Tierversuch nachweisbar blieb und aus ihnen durch Auswaschen nicht wieder in Freiheit gesetzt werden konnte. Zu gleichen Ergebnissen gelangte Sangiorgi bei analogen Experimenten mit dem Virus der von de Gasperi und Sangiorgi beschriebenen Meerschweinchenpest; er fällte die virulenten Blutsera infizierter Meerschweinchen mit kolloidalem Eisenhydrat oder durch CO_2, fand die überstehenden Flüssigkeiten apathogen, die abzentrifugierten Niederschläge hochinfektiös und vermochte ebensowenig wie Mrowka den Infektionsstoff durch Waschprozeduren vom Eiweißpräzipitat zu isolieren. In der Erklärung der Beobachtung weicht jedoch Sangiorgi von Mrowka ab und hält die mechanische Adhäsion des Virus an die Eiweißsubstanz für wahrscheinlicher als die Annahme einer kolloidal gelösten, nicht organisierten Virusform. Die Hühnerpestversuche nahm dann S. Miyaji unter Leitung von Provazek wieder auf, bestätigte die restlose Ausflockbarkeit dieses Virus mit Tannin, war dagegen nicht imstande, infektiöse Hühnerserumverdünnungen dadurch avirulent zu machen, daß er sie nach Rossi enteiweißte (wiederholtes Einfrieren und Zentrifugieren in gefrorenem Zustande) oder in ihnen durch Zusatz eines Antihühnerkaninchenserums eine spezifische Immunpräzipitation hervorrief. In parenthesi bemerkt, war die letzterwähnte Versuchsanordnung nicht gerade als rationell zu bezeichnen. Bekanntlich bestehen die Präzipitate, welche sich beim Vermengen von Präzipitinogen und zugehörigem Präzipitin bilden, nicht oder nur zum allergeringsten Teile aus dem Eiweiß der Antigenlösung, sondern der Hauptsache nach aus den Globulinen des Immunserums. (E. P. Pick, Moll, Welsh und Chapman, Calmette und Massol, Doerr und Moldovan, P. Hirsch und K. Langenstraß). Nach dem Schema von Miyaji geht daher vorwiegend Kaninchenei weiß in den Niederschlag ein, so daß die Viruselemente des Hühnerserums höchstens passiv mitgerissen werden können. Denkt man aber an irgendeinen besonderen Konnex der Virusteilchen mit dem Hühnerglobulin, so müßte man trachten, gerade dieses auszuflocken und in folgender Art vorgehen: man würde zunächst Hühner mit Kaninchenserum immunisieren, bis in ihrem Serum Präzipitine festgestellt werden können; dann wären diese Hühner zu infizieren und die infektiösen Sera derselben durch Antigenzusatz (d. h. durch verdünntes Kaninchenserum) zu fällen. Diese Methode dürfte in mehrfacher Beziehung Aufschlüsse bringen; über ihre Ergebnisse soll demnächst berichtet werden.

Vorerst schien es angezeigt, die Bedingungen einer optimalen Fällung von verdünnten Serumlösungen durch Tannin festzustellen. Aus älteren und neueren Angaben (vgl. u. a. auch T. Sollmann) war der maßgebende Einfluß der H-Ionenkonzentration und — falls dieser Faktor als annähernd konstant betrachtet werden durfte — die dominierende Wirkung des gegenseitigen Mengen- resp. Konzentrationsverhältnisses der beiden Reaktionskomponenten (Tannin und Serumeiweiß) zu entnehmen. Ein

relativer Überschuß von Tannin oder von Serum hemmt die Flockung oder verhindert sie völlig; bereits entstandene Präzipitate lösen sich in nachträglich zugesetzten größeren Serummengen wieder auf.

1. Versuch.

Zu steigenden Mengen Ziegenserum wurden steigende Mengen Tannin zugesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug in jeder Eprouvette 3 cm³. Als Verdünnungsflüssigkeit diente 0,85proz. NaCl-Lösung.

T = Trübung, Sp.T. = Spur Trübung, *** = Niederschlag ohne Klärung, **** = Niederschlag mit völliger Klärung der überstehenden Flüssigkeit.

Menge des Ziegenserums cm³	Menge des Tannins g	Resultat	Menge des Ziegenserums cm³	Menge des Tannins g	Resultat
0,02	0,0005	****	0,2	0,0005	—
0,02	0,001	****	0,2	0,001	—
0,02	0,002	****	0,2	0,002	Sp.T.
0,02	0,003	****	0,2	0,003	T
0,02	0,004	****	0,2	0,004	***
0,02	0,005	****	0,2	0,005	****
0,02	0,01	****	0,4	0,003	T
0,02	0,05	****	0,4	0,004	***
0,02	0,1	****	0,4	0,005	***
0,1	0,0005	T	0,4	0,006	***
0,1	0,001	T	0,4	0,008	***
0,1	0,002	***	0,4	0,01	***
0,1	0,003	****	0,4	0,05	****
			0,4	0,1	****

Mit 0,02 cm³ Ziegenserum (3 cm³ Reaktionsvolum) geben also alle Werte von 0,0005 bis 0,1 g Tannin eine massige Fällung mit völliger Klärung der überstehenden Flüssigkeit, mit 0,1 cm³ erst Mengen von 0,003 g aufwärts, mit 0,2 cm³ solche von 0,005 g und mit 0,4 cm³ erst 0,05 g Tannin oder mehr.

Es ist nun klar, daß die Masse des Niederschlages in erster Linie bestimmen wird, in welchem Umfange die in einer Serumeiweißlösung suspendierten Mikroben bei der Ausflockung vom Eiweißkoagel umhüllt und zu Boden gerissen werden. Das läßt sich leicht demonstrieren, wenn man eine Suspension bekannter Bakterien in verdünntem Serum durch steigende Tanninkonzentrationen ausfällt und die Zahl der Bakterien vor Zusatz des Tannins und nach eingetretener Flockung und Abzentrifugieren des Koagels ermittelt.

2. Versuch.

Jedes Röhrchen enthielt 10 cm³ 10fach verdünntes Ziegenserum, ein gewisses Quantum Tanninlösung und so viel 0,85proz. NaCl, daß das Reaktionsvolumen 14 cm³ betrug. Eine Kontrolle bestand nur aus 10 cm³ $^1/_{10}$ Ziegenserum und 4 cm³ 0,85proz. NaCl-Lösung. Vor dem Tanninzusatze kam in jedes Röhrchen 0,1 cm³ einer Emulsion von Kolibazillen (hergestellt aus 16stündiger Schrägagarkultur). Nach Eintritt der Fällung und Zentrifugierung wurde mit je 0,5 cm³ der überstehenden Flüssigkeiten und 0,5 cm³ der Kontrolle eine Agarplatte gegossen und die Zahl der Kolonien nach 24stündiger Bebrütung festgestellt.

Menge des Tannins	Zahl der Kolonien im cm³	Menge des Tannins	Zahl der Kolonien im cm³
0,000 (Kontrolle)	270000	0,05 g	13000
0,01 g	130000	0,075 g	700
0,02 g	33000	0,1 g	450
0,025 g	20000	0,2 g	300

Unter den gewählten Versuchsbedingungen war daher die Keimreduktion nach der Flockung mit 0,1 bis 0,2 g Tannin maximal, etwa 430mal größer als nach Zusatz einer 10 bis 20mal geringeren Tanninmenge; von dem ursprünglichen Keimgehalt der Aufschwemmung blieben nur 0,11% in der überstehenden Flüssigkeit, der Rest war im Niederschlag vorhanden, und zwar in lebendem und vermehrungsfähigem Zustande. Wurde nämlich das Präzipitat aufgewirbelt und möglichst gleichmäßig im Reaktionsvolumen verteilt, so lieferte die Aussaat von Proben Keimzahlen, welche jenen der Kontrolle mindestens gleich kamen; in der Regel waren sie jedoch bedeutend höher (siehe Versuch 3), was auf doppelte Weise zu erklären war. Zunächst dadurch, daß die zur Aussaat bestimmten Quantitäten der gefällten und wiederaufgewirbelten Suspensionen mit der Pipette aufgesaugt und in den flüssigen Nährboden übertragen wurden, wobei die stark bakterienhaltigen feinen Eiweißflocken entweder leichter in die Pipette einströmten als die Flüssigkeit oder in der Pipette rasch nach abwärts sanken, so daß der Bakteriengehalt der ausgesäten Mengen nicht dem der frisch aufgewirbelten Suspensionen entsprach. Zweitens kam die Bakterizidie der verwendeten meist nicht inaktivierten Sera in Betracht, die sich nur in der Kontrolle geltend machen konnte, nicht aber in den mit Tannin versetzten Röhrchen, da die bakteriziden Stoffe unmittelbar nach dem Zusatz von Bakterien durch die starke Eiweißflockung unwirksam gemacht werden müßten. Wurde neben einer Bakteriensuspension in Serum eine Aufschwemmung in reiner Kochsalzlösung als zweite Kontrolle angesetzt, so ergaben sich für letztere bisweilen Keimzahlen, welche mit jenen der ausgefällten und wiederaufgewirbelten Suspensionen gut harmonierten (siehe Versuch 7). Doch konnte die Bakterizidie der Normalsera nicht überall beschuldigt werden, da viele Serumproben zwar nicht durch Hitze inaktiviert, wohl aber lange abgelagert und alexinfrei waren.

Eine vollständige Entkeimung der überstehenden Flüssigkeiten fand im zweiten Versuch nicht statt. Da hierin ein sichtlicher Widerspruch zu den Angaben von Mrowka und Miyaji und unseren eigenen, später mitzuteilenden Erfahrungen lag, denen zufolge Hühnerpestvirus aus virulentem Serum durch Tanninfällung komplett ausgeflockt werden kann, war die Vermutung gerechtfertigt, daß vielleicht Größe, Gestalt und Begeißelung der Mikroben oder die Viskosität ihrer Oberflächen Einfluß haben dürften. Es wurde daher der zweite Versuch mit B. coli (begeißelt), mit Staphylokokken, unversporten Anthraxbazillen und Bazillus Friedländer (schleimige Hülle) nochmals angesetzt.

3. Versuch.

Jede Eprouvette enthielt 10 cm³ 10fach verdünnten Ziegenserums, 0,05 g Tannin (1 cm³ einer 5proz. Lösung) und je 0,1 cm³ einer Bakteriensuspension (hergestellt aus 16stündiger Schrägagarkultur). — Kontrollen mit 1 cm³ 0,85proz. NaCl-Lösung an Stelle der Tanninsolution.

Zugesetzte Bakterienart	Bakterienzahl im cm³ der Kontrolle	Bakterienzahl im cm³ der übersteh. Flüssigkeit nach d. Tanninflockung	Bakterienzahl im cm³ nach dem Aufwirbeln des Präzipitates	Keimreduktion durch die Tanninflockung in % der Kontrolle
B. Friedländer	600000	300	1800000	0,05
B. anthracis	100000	100	125000	0,1
Staphylokokken	500000	1500	4400000	0,3
B. coli	300000	1000	1500000	0,33

Die Differenzen waren somit — bei Organismen von mikroskopischer Größenordnung — nicht sehr erheblich und erwiesen sich überdies bei Änderungen der Flockungsverhältnisse nicht als konstant. So wurden bei einer analogen Versuchsanordnung mit 0,02 g Tannin nur die Anthraxbazillen relativ stark ausgeflockt (bis auf 0,2%) während sich die Zahlen der Friedländerstäbchen nur auf 15%, jene der Staphylokokken auf 6% und jene der Kolibakterien auf 9% reduzieren ließen. Vor allem aber kam es nicht zu einer effektiven Sterilisation der überstehenden Flüssigkeiten durch Erzeugung starker Niederschläge, man mochte nun dieses oder jenes Bakterium verwenden.

Eine größere und unter verschiedenen Fällungsbedingungen zutage tretende Rolle spielt die Art des Serums, in welchem die Mikroben suspendiert werden. In Pferde- oder Ziegenserum z. B. ist die Entkeimung bei der Flockung mit niederen Tanninkonzentrationen weit vollständiger als im Kaninchen- oder Meerschweinchenserum und da die beiden letzgenannten Serumarten auch eiweißärmer sind, daher auch weniger mächtige Niederschläge liefern, so dürfte darin eine Ursache der beobachteten Unterschiede liegen. Es scheint aber noch ein zweiter Faktor zu intervenieren, da sich mit steigender Tanninmenge die Differenzen zwischen Meerschweinchen- und Pferdeserum ausgleichen, während die Entkeimung im Kaninchenserum dauernd unvollständig bleibt; möglicherweise kommt die verschiedene Klebrigkeit der entstehenden Präzipitate in Betracht. Hühnerserum entspricht in seinem Verhalten jedenfalls mehr dem Pferde- als dem Kaninchenserum, was im Hinblick auf die Ergebnisse von Mrowka nicht irrelevant ist.

4. Versuch.

Jedes Röhrchen enthielt 10 cm^3 einer 10fachen Serumverdünnung (Kaninchen-, Meerschweinchen-, Ziegen- oder Pferdeserum), 1 cm^3 einer Tanninlösung (2,5; 5; 10 oder 20%) und 0,1 cm^3 einer dichten Koliaufschwemmung (aus 16stündiger Schrägagarkultur). — Kontrollen mit 1 cm^3 Kochsalzlösung. Nach dem Zusatze der Bakterien und des Tannins kamen die Röhrchen für 3 Stunden in den Eisschrank, wurden dann zentrifugiert, und von den überstehenden Flüssigkeiten je 0,1 und 0,5 cm^3 zu Agarzählplatten verarbeitet.

Art des Serums	Menge des Tannins	Kolonienzahl in der überstehenden Flüssigkeit
Meerschweinchen	0,025	4500
Kaninchen	0,025	8000
Pferd	0,025	1800
Meerschweinchen	0,05	800
Kaninchen	0,05	1500
Pferd	0,05	700
Meerschweinchen	0,1	350
Kaninchen	0,1	2000
Pferd	0,1	400
Meerschweinchen	0,2	700
Kaninchen	0,2	5000
Pferd	0,2	300
Ziege	0,2	300
Kaninchen	0 Kontrollen	520000
Pferd	0 Kontrollen	525000

Die evidente Überlegenheit des Pferdeserums in diesen vergleichenden Reihen veranlaßte erneute Versuche in der Richtung, ob nicht bei Verwendung dieser Serumart die Bakterienausflockung verbessert d. h. vollständiger gestaltet werden kann. Auch hatte sich inzwischen herausgestellt, daß gewisse Vorsichtsmaßregeln das Endresultat beeinflussen, so vor allem das ruhige Stehen der Röhrchen während des Flockungsablaufes und die Einschaltung eines längeren (5 bis 6stündigen) Intervalles zwischen Flockung und Abzentrifugieren der Niederschläge.

5. Versuch.

Jedes Röhrchen enthielt 10 cm³ 10fach verdünnten Pferdeserums, 0,1 cm³ einer Bakteriensuspension und 1 cm³ einer 10proz. Tanninlösung. — Kontrollen mit 0,1 cm³ Bakteriensuspension in 10 cm³ $^1/_{10}$ Pferdeserum und 1 cm³ NaCl. — Die Bestimmungen der Keimzahlen erfolgte durch Gießen von Agarzählplatten mit je 0,1 cm³ Flüssigkeit aus den Kontrollröhrchen (K.), aus den nach Tanninflockung und Abzentrifugieren der Niederschläge resultierenden klaren überstehenden Flüssigkeiten (F.), und den trüben, durch Wiederaufwirbeln der abzentrifugierten Niederschläge erhaltenen Gemischen (P.). Das Intervall zwischen Flockung und Abzentrifugieren der Flocken belief sich auf 5 Stunden, während welcher Zeit die Röhrchen im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

Bakterienspezies	Art der Probe	Keimzahl im cm³
B. Friedländer	K.	1100000
	F.	40
	P.	1300000
Staphylokokken	K.	1320000
	F.	10
	P.	1950000
B. megatherium	K.	150000
	F.	50
	P.	170000

Diesmal wurden also Reduktionen auf 0,03 ja auf 0,0007% erzielt, was immerhin eine wesentliche Annäherung an die Ergebnisse bei der Ausflockung des Hühnerpestvirus mit den Proteinen seiner Suspensionsflüssigkeiten bedeutet. Steril wurden aber die überstehenden Flüssigkeiten nicht; nehmen wir, was sehr wahrscheinlich ist, an, daß das Huhn für das Virus eine Art „Einkeimdisposition" besitzt, so ist der früher betonte Gegensatz nicht völlig behoben, speziell wenn wir noch berücksichtigen, daß so vollständige Entkeimungen, falls es sich um Bakterien handelt, nur ausnahmsweise zu beobachten sind, während sie beim infektiösen Hühnerserum anscheinend regelmäßig und ohne besondere Kunstgriffe zustande kommen.

Die Immunpräzipitation alteriert den Keimgehalt einer Bakteriensuspension, in welcher sie abläuft, nur unbedeutend, auch wenn man dafür Sorge trägt, daß die quantitative Relation zwischen Präzipitinogen und Präzipitin sowie die Wirkungsstärke des letzteren so bemessen wird, daß möglichst voluminöse Präzipitate entstehen. Die Ursachen sind einmal darin zu suchen, daß die Masse der Niederschläge doch noch immer weit hinter einer optimalen Tanninfällung zurückbleibt, anderseits auch auf die geringe Reaktionsgeschwindigkeit zu beziehen, mit der sich die durch Antigen-Antikörper-Reaktionen ausgelösten Eiweißflockungen vollziehen. Diese Tatsachen geben eine wenigstens partielle Erklärung, warum Miyaji nicht imstande war, infektiöses Hühnerserum durch Zusatz von Anti-

hühnerkaninchenserum in eine avirulente überstehende Flüssigkeit und einen virulenten Niederschlag zu scheiden.

6. Versuch.

In zwei Zentrifugengläser kommen je 10 cm³ 1000fach verdünntes Menschenserum und je 0,1 cm³ einer dichten Emulsion von Kolibazillen. Röhrchen I erhält einen Zusatz von 2 cm³ inaktivierten Normalkaninchenserums, II einen Zusatz von 2 cm³ eines längere Zeit abgelagerten, sehr hochwertigen Menschenpräzipitins vom Kaninchen. In II trat schon nach 2 Min. (bei 10° C) eine Trübung auf, die sich innerhalb einer halben Stunde zu Flocken verdichtete und nach 1 Stunde war die Sedimentierung in vollem Gange. Nach 3 Stunden wurden beide Röhrchen zentrifugiert und mit je 0,1 cm³ der überstehenden Flüssigkeiten resp. der oberen Partie des Gemisches Agarzählplatten gegossen. I enthielt im cm³ 580000, II noch immer 480000 Kolikeime; der Keimgehalt war somit durch die Flockung nur auf 83% herabgesetzt worden.

Dagegen verhalten sich die Bakterien bei einer Aussalzung der Globuline durch $^1/_3$ Sättigung mit Ammonsulfat ganz ähnlich wie bei der Tanninfällung. Auch die Globulinflockung durch Abdialysieren der Salze hat unter Beachtung bestimmter Kautelen eine 1000fache Keimreduktion in der überstehenden Flüssigkeit zur Folge, obwohl natürlich die in den Niederschlag übergehenden Eiweißfraktionen bei den drei genannten Prozessen wesentlich voneinander verschieden sind. Daß nicht etwa nur ausflockende Globuline Bakterien mitreißen, läßt sich zeigen, wenn man die Globuline[1]) aus Pferdeserum durch Dialyse und Abzentrifugieren entfernt, im globulinfreien[1]) Pferdeserum Bakterien aufschwemmt und die Albumine durch Tannin ausfällt.

7. Versuch.

In ein Zentrifugenglas werden 10 cm³ konzentriertes Pferdeserum und 0,1 cm³ Kolisuspension eingefüllt, sodann 5 cm³ konzentrierte Ammonsulfatlösung zugesetzt. Nach eingetretener Flockung wird zentrifugiert. Anlegen von Agarzählplatten mit 0,1 cm³ der überstehenden Flüssigkeit. Sodann wird der Bodensatz möglichst homogen im Reaktionsgemisch verteilt und mit 0,1 cm³ der stark trüben Flüssigkeit neuerlich eine Agarzählplatte angelegt, (A). — Als Kontrollen dienten: 10 cm³ Pferdeserum und 0,1 cm³ Koliaufschwemmung + 5 cm³ 0,85% NaCl (B), und 15 cm³ NaCl + 0,1 cm³ Kolisuspension (C).

Probe	Kolonienzahl im cm³
A) Überstehende Flüssigkeit	340
A) Aufgewirbelter Bodensatz	670000
B)	200000
C)	800000

8. Versuch.

In eine Fischblase wird ein Gemenge von 3 cm³ Pferdeserum, 12 cm³ destillierten Wassers und 0,1 cm³ einer Kolisuspension eingefüllt und so lange gegen mehrmals gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert, bis die angesäuerte Außenflüssigkeit mit $AgNO_3$ keine Spur von Trübung gibt. Nun wird vorsichtig von der über dem ausgefällten Globulin stehenden Flüssigkeit mit einer Pipette eine Probe entnommen und zur Zählplatte verarbeitet, welche einen Gehalt von 35000 Keimen pro cm³ feststellen läßt. Hierauf wird der gesamte Inhalt der Fischblase in ein Zentrifugengefäß überpipettiert, das Globulin aufgewirbelt und möglichst homogen verteilt und sofort eine weitere Zählplatte angelegt; die Zählung ergibt 1500000 Kolonien.

1) Gemeint sind die in Wasser unlöslichen Globuline.

Dann wird bis zur völligen Klarheit zentrifugiert und der Keimgehalt der überstehenden Flüssigkeit bestimmt; er beläuft sich nunmehr auf 1500 Keime.

Das Präzipitat, nach Abhebern der überstehenden Flüssigkeit mit destilliertem Wasser mehrmals gewaschen, in 14,4 cm³ NaCl Lösung aufgelöst (das Präzipitatvolum war mit 0,6 cm³ bestimmt worden), hatte auf das Volum des ursprünglichen Reaktionsvolums berechnet, 1180000 Kolibazillen im cm³.

Aus einer vor der Dialyse angestellten Kontrollzählung ging hervor, daß das Gemisch einen Ausgangsgehalt von 1800000 Keimen pro cm³ besessen hatte, so daß die Übereinstimmung aller gefundenen Werte wohl als recht zufriedenstellend bezeichnet werden darf.

Übersichtlich geordnet lauten die Daten:

Keimgehalt vor der Dialyse	1800000
Keimgehalt der überstehenden Flüssigkeit unmittelbar nach der Dialyse, ohne Zentrifugierung	35000
Keimgehalt nach Verteilung des Globulinsedimentes durch Aufwirbeln	1500000
Keimgehalt der durch Zentrifugieren erhaltenen überstehenden Flüssigkeit	1500
Keimgehalt des Präzipitates (auszentrifugierten und in NaCl-Lösung aufgelösten Globulinsedimentes)	1180000

9. Versuch.

$^1/_{10}$ Pferdeserum wird in einer Fischblase gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis in der Außenflüssigkeit keine Chlor-Ionen nachweisbar sind. Das ausgefällte Globulin wird abzentrifugiert, das vom Globulin befreite Pferdeserum (10 cm³) mit 0,1 cm³ Kolisuspension und mit 1 cm³ 10proz. Tanninlösung versetzt. Abzentrifugieren nach 3 Stunden. — Zählplatten: aus einer Kontrolle ($^1/_{10}$ dialysiertes Pferdeserum ohne Tannin), aus der überstehenden Flüssigkeit, und dem Gemisch nach Aufwirbeln des Niederschlages.

Kontrolle	500000
Überstehende Flüssigkeit	5000
Aufgewirbeltes Präzipitat	2900000

Hinsichtlich des 8. Versuches sei auf den Unterschied im Keimgehalt aufmerksam gemacht, welchen das Zentrifugieren nach der Ausflockung der Globuline herbeiführt; offenbar halten sich feine, bakterienhaltige Globulinflocken wegen ihrer geringen Dimensionen schwebend und gehen erst unter der Einwirkung der Zentrifugalkraft rasch zu Boden. Mrowka hat das durch Dialyse von den wasserunlöslichen Globulinen befreite Hühnerserum stets erst zentrifugiert, bevor er die überstehende Flüssigkeit auf ihre Infektiosität prüfte; anderenfalls wären wohl abweichende Ergebnisse erhalten worden.

* * *

Nach diesen Vorarbeiten wurden die eigentlichen Experimente mit Hühnerpest in Angriff genommen. Das Institut verfügte über zwei Virusstämme, die von Prof. Kleine (Berlin) und Prof. Ascoli (Mailand) in bereitwilligster Weise zur Disposition gestellt worden waren, wofür wir beiden Herren auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen möchten. Das Berliner Virus erwies sich insofern als minder geeignet, als die Sera der infizierten Hühner oft schon in 100facher Verdünnung (in Mengen von 0,001 cm³) nicht mehr infizierten und auch in sehr großen Dosen nicht den gewohnten akuten Krankheitsverlauf zur Folge hatten, sondern erst

nach 2 bis 3 Tagen tötlich wirkten. Reihenversuche mit fallenden Mengen virulenten Serums ergaben ganz auffallende Unregelmäßigkeiten, wie aus folgendem Beispiel ersichtlich ist:

10. Versuch.

Huhn Nr. 32 wird am 12. I. 1921 mit virulentem Hühnergehirn intramuskulär injiziert; es erkrankt erst am 14. I., und sein im schwerkranken Zustande abgenommenes Serum wirkt wie folgt:

Huhn	Nr. 35	erhält	0,2 cm³	verendet	nach	60	Stunden
»	» 19	»	0,02 cm³	»	»	72	»
»	» 34	»	0,002 cm³	»	»	36	»
»	» 18	»	0,002 cm³	überlebt			
»	» 33	»	0,0002 cm³	»			

Das italienische Virus hatte eine zweifellos höhere Virulenz und die damit infizierten Hühner verendeten innerhalb kürzerer Zeiten, gleichgültig ob Hirnemulsion, defibriniertes Blut oder erythrocytenfreies Blutserum als Infektionsstoff benutzt wurde. Das Blutserum war bei diesem Stamm noch in Mengen von 0,0001, meist auch 0,00001 cm³ pathogen und schien daher alle Qualitäten zur Nachprüfung der Mrowkaschen Tanninfällungen mit Hilfe einer quantitativen Methodik zu besitzen, welcher sich weder Mrowka noch auch Miyaji bedient hatten, obwohl von dosologischen Abstufungen mit Recht Aufklärungen zu erwarten waren. Insbesondere war es angezeigt, festzustellen, ob die überstehende Flüssigkeit nach Ausflockung von Hühnerpestserum mit Tannin tatsächlich vollständig, d. h. auch in größeren Gaben avirulent wurde und ob diese Einbusse an Infektiosität im Niederschlag quantitativ nachzuweisen war oder nicht.

11. Versuch.

Huhn 6 wurde mit Gehirn von Huhn 5 intramuskulär injiziert; nach 37 Stunden wurde ein Aderlaß aus der Flügelvene gemacht; zu dieser Zeit war Huhn 6 schwer krank, hatte Diarrhoe, zeigte schleimigen Ausfluß aus dem Schnabel und sank, sich selbst überlassen, wie schlaftrunken nieder. 12 Stunden nach dem Aderlaß plötzlicher Exitus unter Krämpfen. Das Aderlaßblut blieb 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, wurde dann zentrifugiert und das abgeschiedene Serum in nachstehender Art behandelt: 1 cm³ Serum wurde mit 10 cm³ 0,85proz. NaCl:A)-Lösung versetzt; die Mischung stand 3 Stunden bei Zimmertemperatur sodann erhielten:

Huhn 10: 0,1 cm³ (= 0,01 Originalhühnerserum) intramuskulär. Das Tier verendete nach ca. 30 Stunden an Hühnerpest.

Huhn 7: 0,001 cm³ (= 0,0001 cm³ Originalserum) intramuskulär. Exitus nach 43 Stunden.

B) 1 cm³ Serum wurde mit 9 cm³ 0,85proz. NaCl-Lösung verdünnt und 1 cm³ einer 10proz. Tanninlösung (in 0,85% NaCl-Lösung) hinzugefügt. Nach eingetretener Flockung blieb das Gemenge bei Zimmertemperatur stehen, wurde sodann zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit zwei Hühnern in der Menge von 0,1 und 0,001 cm³ eingespritzt. Hierauf wurde der Bodensatz aufgewirbelt, möglichst homogen im Reaktionsvolum verteilt und von dem trüben Gemenge bekamen zwei weitere Hühner die bereits erwähnten Dosen. Alle Verdünnungen zwecks Abmessung der zu injizierenden Quantitäten erfolgten mit 0,85proz. NaCl-Lösung und mit sterilen Pipetten; für jede Verdünnung wurde eine besondere Pipette benutzt, das Injektionsvolumen belief sich stets auf einen ganzen cm³.

1. Virulenz der überstehenden Flüssigkeit:

Huhn 11: 1 cm³ (= 0,1 Originalserum) i. m.; überlebt (während der Beobachtungsperiode von 16 Tagen ohne jedes Krankheitszeichen).

Huhn 12: 0,1 cm³ (= 0,01 Originalserum); überlebt.

2. Virulenz des gesamten Reaktionsgemisches nach dem Wiederaufwirbeln des Präzipitates:

Huhn 8: 0,1 cm³ (= 0,01 Originalserum); verendet an Hühnerpest in 54 Stunden.

Huhn 14: 0,001 cm³ (= 0,0001 Originalserum); überlebt, zeigt während einer 16tägigen Beobachtung keine Krankheitserscheinungen.

Aus diesem Experiment, dessen Resultate nach keiner Richtung innere Widersprüche erkennen lassen, geht hervor, daß die nach Tanninflockung und Abzentrifugieren der Eiweißniederschläge gewonnenen überstehenden Flüssigkeiten, die übrigens ganz klar und völlig farblos waren, auch in relativ großen Quanten Hühner nicht mehr zu infizieren vermochten. Mindestens 10000, vielleicht aber auch 100000 oder mehr letale Dosen Hühnerpestvirus waren durch die Ausflockung des Eiweißes jedem cm³ des Gemisches entzogen worden und letzteres war daher, wenn wir nur das Virus ins Auge fassen, de facto steril geworden. Aber das Defizit fand sich im Präzipitate nicht wieder; 0,001 cm³ Niederschlag (berechnet auf das Ausgangsvolumen) infizierte nicht und selbst 0,1 cm³ wirkte noch immer etwas schwächer als 0,001 cm³ der Kontrolle.

Die Tanninflockung hatte also die Infektiosität des gesamten Reaktionsgemisches auf den hundersten Teil ihres Wertes vermindert; es waren ca. 99% des Hühnerpestvirus zugrunde gegangen, sie hatten ihre Vermehrungsfähigkeit im lebenden Huhn eingebüßt. Dieser Umstand allein genügt, um Mrowkas Annahme vom Globulincharakter des Virus zu entkräften, und den Gedanken an tanninempfindliche Mikroben nahezulegen. Sogar für Bakterien ist Tannin nicht indifferent.

12. Versuch.

Zu Röhrchen, welche je 10 cm³ verschieden konzentrierter Tanninsolutionen (in 0,85proz. NaCl) enthalten, werden je 0,1 cm³ einer Suspension von Anthraxbazillen (24stündige Schrägagarkultur) zugesetzt. Nach einer halben und einer Stunde werden Zählplatten gegossen; nach 3, 6 und 10 Stunden werden Mäuse mit je 0,5 cm³ intraperitoneal geimpft. Die Ziffern bedeuten die Zahlen der Kolonien auf den Zählplatten; — bedeutet negativen Ausfall des Tierversuches, + dagegen die gelungene Milzbrandinfektion.

Zeiten der Probeentnahme	Tanninkonzentrationen				
	1 ‰	2 ‰	5 ‰	1 %	2 %
nach ½ Stunde	∞	26 000	20 000	15 000	1000
„ 1 „	4500	4200	6 000	7 000	+
„ 3 Stunden	+	+	+	—	—
„ 6 „	+	+	+	—	—
„ 10 „	+	+	+	—	—

Tanninkonzentrationen von 1 bis 2% töten also Milzbrandstäbchen nach dreistündiger Einwirkungsdauer vollständig ab; Keimverminderung war schon bei weit stärkeren Tanninverdünnungen merklich. Wenn in zehnfach verdünntem Pferde-Ziegen-Meerschweinchenserum die Bakterizidie und entwicklungshemmende Kraft des Tannins nicht manifest wurde, so lag das daran, daß eben das Tannin

durch Eiweiß gebunden und unwirksam wurde, so lange kein bedeutender Tanninüberschuß im Reaktionsgemisch vorhanden war.

Tierische Parasiten sind gegen Tannin weit empfindlicher; sie werden auch durch niedrige Konzentrationen (1:1000 und darunter) rasch abgetötet, falls kein Eiweiß zugegen ist. Eiweiß wirkt schützend aus denselben Gründen, aus welchen es die desinfektorische Kraft des eiweißfällenden Sublimates herabsetzt; an Dysenterieamöben wurde die abtötende Wirkung des Tannins und der antagonistische Einfluß von Eiweiß längst ziemlich genau analysiert. Hier sei zur Illustration das Verhalten von Nagana-Trypanosomen angeführt.

13. Versuch.

Eine mit Nagana-Trypanosomen infizierte Maus wurde auf der Höhe der Infektion getötet und ihr Blut mit 1000fach verdünntem Meerschweinchenserum so weit diluiert, daß 0,5 cm³ 2300 Trypanosomen (in der Zählkammer gezählt) enthielten. Die Verdünnung des Mausblutes erfolgte mit Meerschweinchenserum (1:1000), weil reine NaCl-Lösung stark trypanozide Effekte aufwies, während die gewählte Serumverdünnung innerhalb der Versuchsdauer weder die Beweglichkeit noch die Virulenz der Trypanosomen beeinträchtigte, so daß das beobachtete Absterben der Trypanosomen auf das Tannin zurückgeführt werden durfte. Es wurde nun einerseits eine Kontrolle (10 cm³ Trypanosomenaufschwemmung) angesetzt, anderseits 3 Röhrchen mit je 9 cm³ Trypanosomenemulsion aufgestellt, wovon Nr. 1 einen Zusatz von 1 cm³ 50fach verdünnter, Nr. 2 von 1 cm³ 500fach und Nr. 3 von 1 cm³ 1000fach verdünnter Tanninlösung erhielten. Die Konzentration des Tannins belief sich also in Nr. 1 auf 2 : 1000 (= 2‰), in Nr. 2 auf 0,2‰ und in Nr. 3 auf 0,1 ‰. — Nach 5, 15, 30 und 60 Min. wurden je 0,5 cm³ aus der Kontrolle wie aus jedem der 3 Tanninröhrchen einer weißen Maus injiziert. * bedeutet Tod an Naganainfektion, die zugefügte Ziffer gibt das Intervall zwischen Infektion und Exitus in Tagen an, — bedeutet negatives Resultat, d. h. Überleben des Versuchstieres bei dauernd negativem Blutbefund. (Beobachtungsdauer 12 Tage.)

Tanninkonzentration	Einwirkungsdauer 5 min	15 min	30 min	60 min
0 (Kontrolle)	*6	*6	*6	*6
0,1 ‰	*7	*8	—	—
0,2 ‰	*7	—	—	—
2 ‰	—	—	—	—

Für Trypanosomen wird somit bereits eine Tanninkonzentration von 1:10000 bei 30 Min. langer Einwirkung deletär, selbst wenn geringe Mengen schützender Eiweißkörper vorhanden sind. Je höher die Tanninkonzentration bei gegebener Eiweißmenge steigt, desto mehr verkürzt sich die zur Abtötung notwendige Zeit, bis sie schließlich nur mehr wenige Minuten beträgt.

Das Hühnerpestvirus nähert sich in seiner Empfindlichkeit gegen verschiedene Agentien (Saponin, Galle) sehr den tierischen Mikroorganismen; auch in bezug auf seine Tanninempfindlichkeit scheint es die Bakterien zu übertreffen, ohne jedoch die extreme Hinfälligkeit der Trypanosomen oder Amöben zu erreichen. Von diesem Standpunkt aus bereitet die Analyse der Versuche von Mrowka, Miyaji und mir keine Schwierigkeiten. Das Tannin reißt durch die von ihm verursachte Eiweißflockung die in Serum, in Exsudaten usw. suspendierten Hühnerpestelemente zunächst mechanisch mit, wodurch die Zahl der letzteren auf 1:1000 bis 1:10000

ihres ursprünglichen Wertes abstürzt; gleichzeitig werden die in der überstehenden Flüssigkeit zurückbleibenden Viruspartikelchen durch Tannin geschädigt, und zwar um so intensiver, je länger man nach dem Zusatze des Gerbstoffes zuwartet und je beträchtlicher der relative Überschuß des Tannins über das Eiweiß ist. Die fehlende Infektiosität der überstehenden Flüssigkeiten ist dann nicht weiter merkwürdig, sondern selbstverständlich und mit der Annahme eines belebten Infektionsstoffes viel weniger in Widerspruch als mit der eines Kontagium inanimatum in Form einer Globulinvariante. Ganz besonders mußte der desinfektorische Effekt des Tannins in den Versuchen von Miayji hervortreten, der das virulente Serum zunächst 500fach verdünnte und dann Tannin wiederholt und in effektivem Überschuß zufügte. Die Virulenz der Präzipitate rührt von den durch das Eiweiß mitgerissenen Virusteilchen her, die durch ihre Umhüllung mit dem stark adsorbierenden Mantel der Tannin-Eiweißverbindung vor der raschen Abtötung durch einen vorhandenen Tanninüberschuß geschützt sind, ein Schutz, welcher, wie gezeigt werden konnte, nicht unter allen Umständen ausreicht.

Bei der Fällung mit Ammonsulfat oder durch Dialyse liegen die Verhältnisse ähnlich; im ersten Falle wirkt die starke Hypertonie, im zweiten die Hypotonie schädigend auf lebende Zellen und bei beiden Versuchsanordnungen sind die in der überstehenden Flüssigkeit frei suspendierten Mikroben der Noxe stärker exponiert als die vom Eiweißkoagel umgebenen im Präzipitat.

Mrowka führt noch an, daß es ihm durch Waschen der virulenten Präzipitate nicht gelungen sei, das Virus vom Eiweiß zu trennen; die Waschwässer seien stets avirulent geblieben. Es unterliege daher keinem Zweifel, daß das filtrierbare Virus dem Eiweiß der Substrate, in denen es vorkommt, anhafte, und daß es entweder ein selbständiger eiweißartiger Körper sei, oder daß das Eiweiß der Körperflüssigkeiten des Huhnes selbst zum Virus werde. Diese Argumentation ist nicht zwingend. Schon im Jahre 1909 konnten Kraus, v. Eisler und Fukuhara zeigen, daß verschiedene Stoffe wie z. B. Gewebszellen, Kaolin, Kohle usw. imstande sind, Lyssavirus oder auch Hühnerpestvirus zu fixieren und daß die „Wiederabspaltung" des im Adsorbens vorhandenen und nachweisbaren Virus durch einfaches Waschen der virusbeladenen Stoffe mit physiologischer NaCl-Lösung nicht immer gelingt. Ähnliche Angaben finden sich auch bei Rosenthal, Ruß, Doerr und R. Pick. Es wurde versucht, wie sich ausgeflockte Bakterien gegen die Waschprozeduren verhalten und da ergab sich ebenfalls, daß der Niederschlag die Mikroben zähe festhält, und daß diese nur schwer und sehr unvollständig wieder auswaschbar sind.

14. Versuch.

10 cm^3 10fach verdünntes Perdeserum werden mit 0,1 cm^3 Kolisuspension und mit 1 cm^3 10proz. Tanninlösung versetzt, bleiben dann 2 Stunden im Eisschrank und werden 30 Minuten zentrifugiert. Sodann wurde die überstehende Flüssigkeit abgehebert, durch sterile physiologische Kochsalzlösung ersetzt, der Niederschlag aufgewirbelt und neuerdings zentrifugiert; die Prozedur wurde dreimal wiederholt. Die Bestimmung des Keimgehaltes erfolgte durch Agarzählplatten bei der überstehenden Flüssigkeit, beim ersten, zweiten und dritten

Waschwasser und bei dem nach dem dritten Waschen in 11 cm³ physiologischer Kochsalzlösung möglichst homogen verteilten Präzipitate.

Bezeichnung der Probe	Keimgehalt im cm³
Überstehende Flüssigkeit	60
Erstes Waschwasser	2000
Zweites Waschwasser	7000
Drittes Waschwasser	800
Aufgewirbelter Niederschlag nach dem dritten Waschen	540000

Die überwiegende Menge der Kolibazillen blieb also im Eiweißniederschlage stecken. Die Waschwässer waren allerdings nicht steril, wie man das angesichts der Angaben von Mrowka über die Nichtinfektiosität der Waschwässer virulenter Hühnerpesteiweißpräzipitate hätte erwarten können; diese Differenz ist aber wahrscheinlich auf die viel bedeutendere Größe der Kolibazillen, auf ihre Eigenbeweglichkeit ,vor allem aber darauf zurückzuführen, daß die Hühnerpestkeime nur dann vor der Tanninwirkung geschützt bleiben, wenn sie allseits von Eiweiß umhüllt, daher nicht auswaschbar sind.

Für die Zellnatur der filtrierbaren Krankheitserreger läßt sich außerdem noch ein Beweis positiver Natur heranziehen. Es sind in der letzten Zeit zahlreiche Untersuchungen über die sog. oligodynamischen Wirkungen angeführt worden, aus denen geschlossen werden mußte, daß die Oligodynamie Zellen aller Art schädigt, daß man sie als ein Zellgift betrachten darf, welches von der biologischen Eigenart der Zelle im weitesten Umfange unabhängig ist. Die oligodynamischen Stoffe töten Algen (Nägeli), Bakterien, Protozoen (Salus), sie hämolysieren Erythrozyten (Wollmann, Hausmann, Doerr, Heß und Reitler, Luger); es lag daher nahe, die oligodynamische Empfindlichkeit des Hühnerpestvirus zu prüfen, um so mehr als Funktionen nicht organisierter Stoffe durch blanke Metalle nur wenig beeinflußt werden, auch wenn sie sonst sehr labil und so leicht zerstörbar sind wie etwa die Komplementwirkung frischen Meerschweinchenserums (mündliche Mitteilung von Doerr).

In der Oligodynamie darf man daher bis zu einem gewissen Grade tatsächlich ein Differenzierungsmittel zwischen lebenden Zellen und nicht organisierten Stoffen erblicken, wenn auch kein absolut zuverlässiges, da ja nach Baumgarten und Luger auch Fermente, Toxine durch oligodynamische Einflüsse leiden. Immerhin bestehen doch sehr evidente quantitative Unterschiede in der oligodynamischen Resistenz von Zellen und nicht belebten Stoffen, welche die erwähnten Versuche als gerechtfertigt erscheinen ließen.

Eiweißgegenwart schwächt die oligodynamischen Wirkungen bekanntlich ab; darauf mußte geachtet werden, da sich das Hühnerpestvirus nur in stark eiweißhaltigen Flüssigkeiten vorfindet und unbeschädigt vom Eiweiß nicht abgetrennt werden kann. Ein Ausweg bestand in der Möglichkeit, das virulente Hühnerserum 1000fach zu verdünnen; anderseits wurde das blanke Silber in den Hühnerserumverdünnungen belassen, wobei der antagonistische Effekt des Eiweißes schließlich überwunden wird (vgl. auch Luger). Um Kontrollen zu gewinnen und um die oligodynamische Resistenz der Hühnerpestkeime mit jener von bekannten Bakterien und Protozoen zu vergleichen, wurden Kolibazillen und Nagana-Trypanosomen unter völlig identischen Bedingungen untersucht.

15. Versuch.

In eine kleine Glasdose wurde eine Silbermünze (Fünffrankenstück) gelegt und mit 10 cm³ physiologischer NaCl-Lösung überschichtet. Nach 16stündigem Stehen wurde 0,1 cm³ 10fach verdünnten Hühnerpestserums zugefügt, so daß die tatsächliche Verdünnung des virulenten Originalserums 1:1000 betrug. Nach 5, 15 und 60 Minuten sowie nach 3 Stunden wurde je 1 Huhn mit 1,0 cm³ dieser Flüssigkeit intramuskulär geimpft.

In eine zweite gleich große Glasdose kamen 10 cm³ physiologischer NaCl-Lösung und nach 16stündigem Stehen 0,1 cm³ des gleichen 10fach verdünnten virulenten Hühnerpestserums. 3 Stunden nach dem Zusatze des letzteren wurde ein Kontrollhuhn mit 1 cm³ dieser Flüssigkeit intramuskulär injiziert.

Außerdem wurde die Virulenz des Originalserums vor der Verdünnung gemessen; sie war sehr beträchtlich.

a) Virulenz des verwendeten Hühnerpestserums:
Huhn 47 erhält 0,001 cm³ i. m., verendet in 46 Stunden;
Huhn 46 erhält 0,00001 cm³ i. m., verendet in 49 Stunden;

b) Virulenz der oligodynamisch beeinflußten, 1000fachen Serumverdünnung:
Huhn 48 erhält 1 cm³ (= 0,001 cm³ Originalvirus) nach 5 Minuten langer Einwirkungsdauer des Ag, und verendet nach 51 Stunden;
Huhn 49 erhält die gleiche Dosis nach 15 Minuten und verendet nach 48 Stunden;
Huhn 50 erhält die gleiche Dosis nach 60 Minuten und verendet nach 60 Stunden;
Huhn 51 erhält die gleiche Dosis nach 3 Stunden und überlebt dauernd;

c) Kontrolle der Virulenz des 1000fach verdünnten Serums nach dreistündigem Stehen der Verdünnung;
Huhn 52: 1 cm³ i. m. verendet in 48 Stunden.

16. Versuch.

In zwei kleine Glasdosen kommen je 10 cm³ physiologische NaCl-Lösung, in die eine wird ein Fünffrankenstück eingelegt. Nach 16stündigem Stehen wird zu beiden Dosen je 0,1 cm³ einer Aufschwemmung von Kolibazillen im zehnfach verdünntem Meerschweinchenserum zugesetzt, so daß die Serumkonzentration von diesem Augenblick an in beiden Dosen 1:1000 betrug. Nach steigenden Zeitintervallen wird mit je einer Öse Flüssigkeit aus Dose I (olygodynamisch beeinflußt) und Dose II (durch Ag nicht beeinflußt) ein Schrägagarröhrchen beimpft. Nach 24stündigem Aufenthalt im Thermostaten bei 37° C werden die Agarröhrchen kontrolliert und das Wachstum verzeichnet.

Zeitintervalle	I. Oligodynamisch beeinflußt	II. Nicht beeinflußt
2 min	sehr reichliches Wachstum	sehr reichl. Wachstum
5 »	» » »	» » »
10 »	» » »	» » »
15 »	» »	» » »
25 »	spärliches Wachstum	» » »
30 »	kein Wachstum	» » »
45 »	» »	» » »
60 »	» »	» » »
180 »	» »	» » »

17. Versuch.

Versuchsanordnung wie im 15. und 16. Versuch, nur daß die Flüssigkeit in den beiden Glasdosen mit 0,1 cm³ einer Trypanosomenaufschwemmung in zehnfach verdünntem Meerschweinchenserum beschickt wurde; die Dichtigkeit der endgültigen Trypanosomenemulsion belief sich in beiden Dosen auf 2500 Trypanosomen im halben cm³. Nach steigenden Zeitintervallen wurden weiße Mäuse mit je 0,5 cm³ der trypanosomenhaltigen Flüssigkeit aus den Dosen I (oligod.) und II (nicht oligod.) intraperitoneal injiziert.

Zeitintervalle	I. (oligodynamisch)	II. (nicht oligodynamisch)
2 min	überlebt	tot in 6 Tagen
5 »	»	» » 6 »
15 »	»	» » 6 »
30 »	»	» » 6 »
60 »	»	» » 6 »
180 »	»	überlebt

Die Trypanosomen starben also fast momentan ab, wobei allerdings auch die geringe Eiweißkonzentration und zu starke Überwiegen von Na- und Cl-Ionen mitwirkten, da die nicht oligodynamisch beeinflußte Kontrolle 3 Stunden nach der Einsaat der Trypanosomen gleichfalls nicht mehr infektiös war. Erhöhte man den Serumgehalt in der Kontrolle und eliminierte damit gleichzeitig die einseitige Ionenkombination der Suspensionsflüssigkeit, so hielten sich die Trypanosomen viel länger vermehrungsfähig und infektiös; aber die Schnelligkeit der oligodynamischen Abtötung wurde in zahlreichen Versuchen dieser Art nicht vermindert, so daß Trypanosomen ein ausgezeichnetes Reagens für oligodynamische Einflüsse darstellen.

Das Hühnerpestvirus war gegen die oligodynamische Wirkung des Silbers nicht so empfindlich wie die Trypanosomen, sondern zeigte ein Verhalten, welches dem der vegetativen Form der Bakterien entsprach. Immerhin wurden bedeutende Mengen (100 letale Dosen im cm^3) innerhalb von 30 Min. sichtlich abgeschwächt, in einer Stunde komplett abgetötet.

Auch in seiner Resistenz gegen die Giftigkeit reiner NaCl-Lösung schien das Hühnerpestvirus den Bakterien näher zu stehen; vielleicht sind es hier Einfachheiten der Organisation und chemischen Konstitution, welche den tierischen Charakter des Parasiten überdecken.

18. Versuch.

Das Serum eines infizierten Huhnes wirkte in folgender Weise: 0,01 cm^3 intramuskulär tötete Huhn 41 in ca. 48 Stunden, 0,001 cm^3 intramuskulär tötete Huhn 42 in ca. 5 Tagen, 0,0001 cm^3 intramuskulär tötete Huhn 43 in zirka 48 Stunden.

Es wurde eine 1000fache Verdünnung dieses Serums in physiologischer NaCl-Lösung angesetzt und von dieser Verdünnung je 1 cm^3 nach zwei- und vierstündigem Stehen je einem Huhn (Nr. 44 und 45) intramuskulär eingespritzt. Beide Hühner verendeten in ca. 48 Stunden.

Zusammenfassung.

Hühnerpestvirus kann aus Eiweißsolen, in welchen es enthalten ist (Serum, Exsudaten von infizierten Hühnern), durch totale oder partielle Fällung des Eiweißes (mit Tannin, Ammonsulfat, durch Dialyse) so vollständig entfernt werden, daß die überstehenden Flüssigkeitsmassen für Hühner avirulent sind; in den Eiweißniederschlägen läßt sich das Virus durch den Tierversuch nachweisen (Mrowka).

Diese Beobachtung rechtfertigt nicht die Annahme, daß es nicht organisierte, unbelebte, aber doch vermehrungsfähige Vira gibt, welche die Natur gelöster, flockbarer und reversibler Globuline besitzen, sondern erklärt sich durch mechanisches Mitgerissenwerden der zelligen Viruselemente im Verein mit den viruliziden Fähigkeiten der Fällungsmittel (Tannin, Ammonsulfat, Elektrolytenmangel und Hypotonie) zur Genüge.

In den Tanninpräzipitaten aus Hühnerpestserum findet man nur verschwindende Bruchteile der ursprünglichen Virusmengen, welche durch ihre Eiweißumhüllung der Abtötung entschlüpfen. Beide Faktoren (Mitreißung und Schädigung durch das fällende Agens) manifestieren sich in gleicher Weise, wenn man das filtrierbare Virus durch Zellen von mikroskopischer Größenanordnung ersetzt; auch hier erfolgt eine weitgehende Entkeimung (bis auf 0,1, ja 0,01‰) infolge der Ausflockung des Eiweißes der Suspensionsflüssigkeiten; die Keime können ebenfalls in den Niederschlägen nachgewiesen und aus denselben nur zum geringsten Teil durch Waschen wieder frei gemacht werden. Unterschiede zwischen Bakterien und Hühnerpestvirus existieren nur insoferne, als letzteres gegen die Schädigung durch Gerbung (Tannin) viel empfindlicher ist als die meisten vegetativen Bakterienformen und dadurch seine engere Verwandschaft mit den Protozoen dokumentiert, welche auch durch sein Verhalten gegen Saponin und Galle wahrscheinlich gemacht wird.

Gegen oligodynamische Wirkung ist das Hühnerpestvirus etwa so empfindlich wie vegetative Bakterien, was dafür spricht, daß es aus Zellen im eigentlichen Sinne des Wortes besteht. Gegen die Giftwirkung reiner NaCl-Lösung besitzt das Virus ebenfalls die bei den meisten Bakterienspezies beobachtete Resistenz.

Trypanosomen sind gegen die beiden letztgenannten Reagentien wie gegen Tannin maximal empfindlich und stellen ein durch die besondere Organisation bedingtes starkes Extrem der tierischen Parasiten dar.

Tannin bzw. die Widerstandsfähigkeit gegen Gerbstoffe lassen sich wahrscheinlich mit Vorteil verwenden, um die Frage nach der pflanzlichen oder tierischen Natur von Zellen zu beantworten.

* * *

Am Schlusse der vorliegenden Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor R. Doerr für die gütige Überlassung des Thema und für das rege Interesse, das er dem Verlaufe der Untersuchungen entgegengebracht hat, auch an dieser Stelle meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Literaturangabe.

1. Andreiwsky, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 75, 1915.
2. Bauer, Bericht der Deutsch. Bot. Gesellschaft 1904 und 1906.
3. Bechhold, Die Kolloide in der Biologie und Medizin, 2. Aufl.
4. Beijerinck, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 5.
5. Borrel, Annal. d. l'Inst. Pasteur, 1903.
6. Centanni, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 31, 1902.
7. Doerr, Zentralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 50, 1911.
8. Doerr, Biochem. Zeitschr. Bd. 106, 107 und 113, 1920.
9. Doerr und Pick, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 76, 1915.
10. Van Es und Schalk, Annal. d. l'Inst. Pasteur. 1918.
11. von Esmarch, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 32, 1902.
12. Erdmann, Arch. f. Protistenkunde Bd. 41, H. 2, 1920.
13. Frei, Arch. f. wissenschaftl. und praktische Tierheilkunde Bd. 46, H. 3, 1920.
14. Heß und Reitler, Med. Klinik 1920.

15. Hofstädter, Arch. f. Hyg. Bd. 53, 1905.
16. Hunger, Bericht der Deutsch. Bot. Gesellschaft 1905.
17. Hutyra und Marek, Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere, 5. Aufl., 1920.
18. Joest, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 31, 1902.
19. Iwanowsky, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 5.
20. Kraus und Doerr, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 46, 1908.
21. Kraus, v. Eisler, Fukuhara, Zeitschr. f. Imm. Forsch. Bd. I, H. 2, 1909.
22. Kraus und Löwe, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 76, 1917.
23. Landsteiner und Berliner, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 67, 1913.
24. Lipschütz, Handb. d. pathog. Mikroorganismen, 2. Aufl., Bd. 8, 1913.
25. Lode und Gruber, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 30, 1901.
26. Lode, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 31, 1902.
27. Lode, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 43, 1907.
28. Löffler, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 50, Ref. 1911.
29. Marchoux, Compt. Rend. de l'Acad. d. Sciences 1908.
30. Maue, Arbeiten aus dem Kaiserl. Ges.-Amt Bd. 21, 1904.
31. Miyaji, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 74, 1914.
32. Molisch, Bot. Zeitschr., Abt. I, 1908.
33. Mrowka, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 67, 1913.
34. Noguchi, Zentralbl. f. Bakt., Ref. Bd. 69, 1920.
35. Ostertag, Handb. d. pathog. Mikroorganismen Bd. 6, 2. Aufl., 1913.
36. Ottolenghi, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 67, 1913.
37. Provazek, M. M. W. 1908, S. 165, S. 1016 und S. 1524.
38. Rosenthal, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 40, 1906.
39. Roux, Bulletin de l'Inst. Pasteur, 1903.
40. Ruß, Arch. f. Hyg. Bd. 59, 1906.
41. Sangiorgi, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 72, 1914.
42. Salus, Wiener klin. W. 1919, Nr. 51.
43. Seiderhelm, K. R. und R., Arch. f. exp. Pathol. und Pharmakologie Bd. 72, 1914 und Bd. 82, 1918.
44. Sollmann, Journ. of pharmocol. a. exp. therap. Bd. 16, Nr. 1, S. 49 bis 59, 1920. ref. Doerr, Kongreßzentralbl. f. d. gesamte innere Med.
45. Wollmann, Wiener klin. W., 1917.